

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
20. Oktober 2005 (20.10.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/097975 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12N 5/06**

FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Hansastrasse 27c, 80686 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/002313

(72) Erfinder; und

(22) Internationales Anmeldedatum:
4. März 2005 (04.03.2005)

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **KRUSE, Charli** [DE/DE]; Peermoor 33, 23923 Herrnburg (DE). **FUHR, Günter** [DE/DE]; Kavalierstrasse 15, 13187 Berlin (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(74) Anwalt: **HERTZ, Oliver**; V. Bezold & Sozien, Akademiestrasse 7, 80799 München (DE).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

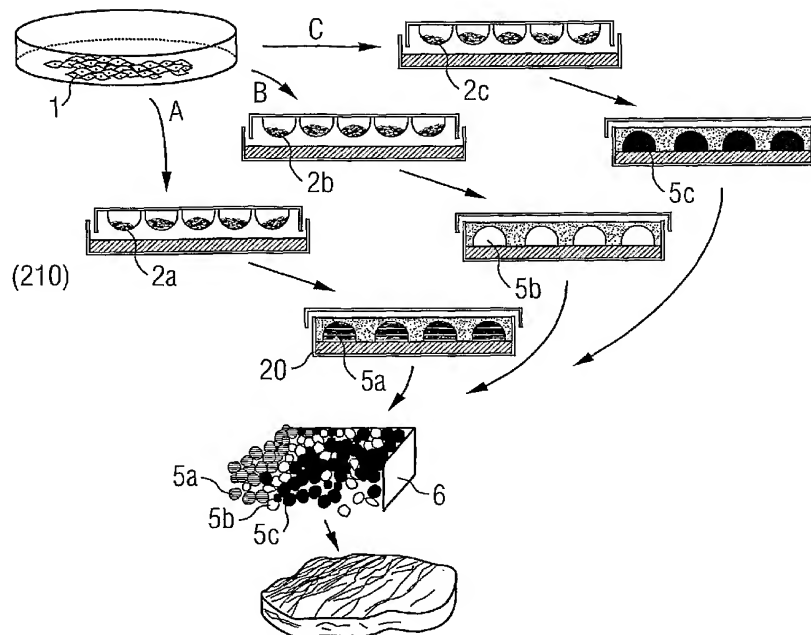
(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 017 484.9 8. April 2004 (08.04.2004) DE

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE PRODUCTION OF A BIOLOGICAL MATERIAL COMPOSITION HAVING AN ANIMAL ORIGIN

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINER BIOLOGISCHEN MATERIALZUSAMMENSETZUNG TIERISCHEN URSPRUNGS



(57) Abstract: The invention relates to a method for the production of a biological material composition having an animal, non-human origin, in particular in the form of animal or human food. Said method consists in forming an aggregation of stem cells from differentiated exocrine glandular tissue of an animal organism in order to form organoid bodies, and in preparing material compositions from the organoid bodies.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2005/097975 A1



PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Es wird ein Verfahren zur Herstellung einer biologischen Materialzusammensetzung tierischen, nicht-menschlichen Ursprungs, insbesondere als Futter- oder Lebensmittel beschrieben, umfassend eine Aggregation von Stammzellen aus differenziertem exokrinen Drüsengewebe eines tierischen Organismus zu organoiden Körpern, und eine Präparation der Materialzusammensetzung aus den organoiden Körpern.

**Verfahren zur Herstellung einer biologischen
Materialzusammensetzung tierischen Ursprungs**

5

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung von biologischen Materialzusammensetzungen tierischen Ursprungs, insbesondere als Futter- oder Lebensmittel, biologische Materialzusammensetzungen, die insbesondere Proteine, Fette und/oder Kohlenhydrate tierischen Ursprungs enthalten, und deren Verwendung.

Die Produktion von Biomasse als Futtermittel zur Ernährung von Tieren ist eine der wichtigsten Herausforderungen der modernen Tierwirtschaft. Wichtige Probleme der konventionellen Produktion von Futtermitteln tierischen Ursprungs, insbesondere für Haustiere oder Nutztiere, bestehen erstens in der Verfügbarkeit biologischen Ausgangsmaterials, dessen Bereitstellung und Gewinnung einen großen wirtschaftlichen Aufwand darstellt und ethische Probleme verursacht, und zweitens in der Gefahr, dass Krankheitserreger in den Nahrungskreislauf eingeschleust und ggf. auf den Menschen übertragen werden.

Ähnliche Probleme bestehen auch bei der Produktion von Lebensmitteln tierischen Ursprungs zur Ernährung von Menschen. Die sog. Fleischproduktion (einschließlich Aufzucht, Tierhaltung und Schlachtung) erfolgt heute unter Bedingungen, die insbesondere für das Befinden von Säugetieren ethisch höchst problematisch sind.

30

Es besteht ein starkes Interesse an einer wachsenden Futter- und Lebensmittelproduktion auf der Grundlage tierischer Ausgangsmaterialien, um beispielsweise den Anforderungen des Bevölkerungswachstums und der Ernährung in Hungergebieten ge-

recht zu werden. Weder eine erweiterte Tierproduktion noch ein verstärkter Fischfang liefern hierzu dauerhafte Lösungen.

Die Aufgabe der Erfindung ist es, verbesserte Verfahren zur
5 Herstellung einer biologischen Materialzusammensetzung tierischen Ursprungs, insbesondere als Futter- oder Lebensmittel, bereitzustellen, mit denen die Probleme der herkömmlichen Futter- oder Lebensmittelproduktion überwunden werden und die insbesondere ermöglichen, Futter- oder Lebensmittel zu produ-
10 zieren, die in ihrer Zusammensetzung und Verwertbarkeit den bisher gewonnenen Tierprodukten gleichwertig oder identisch sind. Ein weiterer Gesichtspunkt der Aufgabe der Erfindung ist es, eine entsprechende biologische Materialzusammensetzung für Futter- oder Ernährungszwecke bereitzustellen, bei
15 deren Produktion die Nachteile der herkömmlichen Tierproduktion vermieden werden, d.h. keine Organismen gezüchtet, gemästet und zu Fleischprodukten verarbeitet werden müssen.

Diese Aufgaben werden durch Verfahren mit den Merkmalen des
20 Anspruchs 1 und eine Materialzusammensetzung mit den Merkmalen des Anspruchs 21 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Anwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

25 Verfahrensbezogen wird die oben genannte Aufgabe durch eine Aggregation von Stammzellen, die aus differenziertem exokrinen Drüsengewebe eines tierischen (nicht-menschlichen) Organismus isoliert wurden, zu dreidimensionalen Zellverbänden und eine anschließende Präparation der gewünschten Material-
30 zusammensetzung auf der Grundlage der Zellverbände gelöst. Die Zellverbände werden im Folgenden auch als organoide Körper bezeichnet. Ein besonderer Vorteil dieses Verfahrens besteht in der kompletten Abkopplung der Biomasseproduktion von der herkömmlichen Tierproduktion, wobei dennoch der herge-

stellten Materialzusammensetzung in Abhängigkeit von dem tierischen Organismus, aus dem die Stammzellen isoliert wurden, und konkreten Differenzierungsbedingungen eine stoffliche, strukturelle und insbesondere geschmackliche Eigenart auf-
5 prägt werden kann.

Die Erfinder haben festgestellt, dass die aus dem exokrinen Drüsengewebe isolierten adulten Stammzellen pluripotent sind und eine hohe Teilungsfähigkeit und ein starkes Wachstum ze-
10 gen. Die Biomasseproduktion erfolgt nicht auf natürlichem Weg durch das Wachstum des Tieres, sondern synthetisch insbesondere bei der Präparation der Materialzusammensetzung in so genannten in-vitro Laborkulturen.

15 Das erfindungsgemäß verwendete exokrine Drüsengewebe kann von einem nicht-humanen erwachsenen Organismus, juvenilen Organismus oder fötalen Organismus, vorzugsweise einem post-natalen Organismus, stammen. Der Begriff "adult", wie in der vorliegenden Anmeldung verwendet, bezieht sich somit auf das
20 Entwicklungsstadium des Ausgangsgewebes und nicht auf dasjenige des Donororganismus, aus dem das Gewebe stammt. "Adulte" Stammzellen sind nicht-embryonale Stammzellen.

Vorzugsweise wird das exokrine Drüsengewebe aus einer Spei-
25 cheldrüse, Tränendrüse, Talgdrüse, Schweißdrüse, aus Drüsen des Genitaltrakts, einschließlich Prostata, oder aus gastro-intestinalem Gewebe, einschließlich Pankreas, oder sekretorischem Gewebe der Leber isoliert. In einer stark bevorzugten Ausführungsform handelt es sich dabei um acinäres Gewebe.

30 Ganz besonders bevorzugt stammt das acinäres Gewebe aus dem Pankreas, der Ohrspeicheldrüse oder Unterkieferspeicheldrüse.

Ein wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, dass die Stammzellen aus lebenden Donortieren,

z. B. aus Speicheldrüsen von Schweinen gewonnen werden können, ohne dass das Donortier geschlachtet werden muss. Dies ist sowohl unter ethischen Gesichtspunkten als auch mit Blick auf die Möglichkeit der weiteren Beobachtung des Donortieres hinsichtlich eventueller Krankheiten von besonderem Vorteil.

Allgemein kann erfindungsgemäß die Materialzusammensetzung unmittelbar aus den organoiden Körpern gebildet werden. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist jedoch vorgesehen, dass die organoiden Körper nach der Aggregation, z. B. in einer Suspensionskultur oder einer Adhäsionskultur unter Nährstoffversorgung zu größeren Körpern wachsen, die im Folgenden als Gewebekörper bezeichnet werden. Die Erfinder haben festgestellt, dass die aus den exokrinen Drüsen isolierten Stammzellen organoide Körper bilden, die bei Nährstoffversorgung ein starkes Wachstum zu Gewebekörpern mit Durchmessern von einigen Millimetern oder darüber zeigen. Die Präparation der Materialzusammensetzung auf der Grundlage der Gewebekörper besitzt den Vorteil einer erhöhten Effektivität der Biomaterialproduktion. Die organoiden Körper enthalten dabei keine Organe oder ein funktionsfähiges Nervensystem, sondern bestehen aus Gewebeschichten verschiedener Zellzusammensetzungen.

Wenn gemäß einer ersten Variante der Erfindung die Aggregation der Stammzellen und/oder das Wachstum der organoiden Körper in einem Kulturmedium ohne eine Zusatz erfolgen, der die Differenzierung der Zellen des organoiden Körpers beeinflussen könnte, wachsen vorteilhafterweise organoide Körper oder Gewebekörper mit einer Zusammensetzung von verschiedenen Zelltypen, die gemeinsam zur Struktur und Verwendbarkeit, insbesondere dem Geschmack der gewünschten Materialzusammensetzung beitragen. Wenn die Aggregation und/oder das Wachstum hingegen in Gegenwart von mindestens einem die Differenzie-

5 rung beeinflussenden Zusatz erfolgt, können organoide Körper oder Gewebekörper mit einem oder mehreren bevorzugten Zelltypen gebildet werden. Es können verschiedene Zelltypen kombiniert werden, die von verschiedenen Donortieren stammen, um bestimmte Nähr- oder Geschmackseigenschaften zu erzielen.

10 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die organoiden Körper oder die aus diesen gewachsenen Gewebekörper zu einem Komposit (Formkörper) zusammengefügt. Wenn die Zellen im Komposit leben, kann vorteilhafterweise ein weiteres Wachstum des Komposits bis zu der gewünschten Größe als Futter- oder Lebensmittel erfolgen. Wenn hingegen die Zellen im Komposit abgestorben sind und nicht weiter wachsen, können sich Vorteile für die weitere Bearbeitung der Materialzusammensetzung ergeben.

20 Gemäß bevorzugten Varianten der Erfindung umfasst daher die Bildung des Komposits einen oder mehrere der folgenden Schritte. Erstens kann ein Zusammenwachsen der beteiligten organoiden Körper oder Gewebekörper zum Komposit vorgesehen sein, das dann vorteilhafterweise weiter wachsen kann. Zweitens kann ein adhärentes Anhaften der beteiligten organoiden Körper oder Gewebekörper vorgesehen sein, wobei auch in diesem Fall ein weiteres Wachstum vorgesehen sein kann. Durch ein Zusammenpressen der organoiden Körper oder Gewebekörper kann ein Verdichten des Formkörpers und damit eine bestimmte Struktur erzielt werden. Schließlich kann eine Übertragung der organoiden Körper oder Gewebekörper auf ein biokompatibles Trägersubstrat aus einem verdaubaren Material vorgesehen sein, auf dem eine weitere Präparation oder Formung der Materialzusammensetzung erfolgt.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann das Komposit einer Formgebung durch eine Prägeein-

richtung unterzogen werden. In diesem Fall können sich Vorteile für die Präsentation der Futter- oder Lebensmittel für deren Verbrauch ergeben. Die Prägeeinrichtung kann z. B. durch ein besonders geformtes Kultivierungssubstrat, wie z. B. das Trägersubstrat, eine Stempelinrichtung mit einer Prägeoberfläche oder einen flexiblen Beutel umfassen, der eine Aufnahmehülle bildet.

Gemäß einer weiteren Modifikation des erfindungsgemäßen Verfahrens kann bei der Präparation der Materialzusammensetzung eine Struktureinstellung vorgesehen sein. Dadurch kann die Materialzusammensetzung mit einer gewünschten Konsistenz, wie z. B. fest, zäh, locker oder dgl. gebildet werden, was insbesondere für die Verwendung als Lebensmittel von Vorteil sein kann. Die Struktureinstellung kann bspw. durch die genannte mechanische Verdichtung erfolgen. Alternativ wird insbesondere, wenn die Gewebekörper elektrisch anregbare Muskelzellen enthalten, eine Struktureinstellung durch eine Einwirkung elektrischer Felder realisiert. Das Komposit wird durch ein elektrisches Feld angeregt, so dass die Muskelzellen eine Struktur bilden, die der von Muskelfleisch ähnlich ist.

Besonders bevorzugt werden die organoiden Körper einer Differenzierung unterzogen, die zu wenigstens einem der folgenden Zelltypen führt, die Muskelzellen, Bindegewebszellen, Fettzellen und Enzym-produzierende Zellen umfassen. In diesem Fall enthalten die organoiden Körper oder entsprechende Gewebekörper vorrangig den differenzierten Zelltyp. Die Differenzierung kann allgemein durch den Zusatz an sich bekannter Differenzierungsfaktoren erfolgen. Besonders bevorzugt erfolgt jedoch bei der Kultivierung der organoiden Körper oder dem Wachstum der Gewebekörper ein Zusatz von bereits differenzierten, insbesondere autologen Zellen, die die weitere

Differenzierung im organoiden Körper oder Gewebekörper auslösen oder beeinflussen.

Wenn die biologische Materialzusammensetzung aus verschiedenen Gruppen organoider Körper oder Gewebekörper, die jeweils verschieden differenziert sind, präpariert wird, können sich Vorteile für die weitere Verwertung der Materialzusammensetzung, insbesondere in Bezug auf die Nährstoffzusammensetzung, die Struktur und den Geschmack ergeben. Alternativ oder ergänzend können der Materialzusammensetzung erfindungsgemäß Geschmacksstoffe zugesetzt werden, wie sie an sich aus der Lebensmitteltechnik bekannt sind.

Ein unabhängiger Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine biologische Materialzusammensetzung, wie zum Beispiel ein Formkörper oder Komposit aus biologischem Material, insbesondere mit Proteinen, Kohlenhydraten und/oder Fetten, die durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellt wurde und deren Verwendung als Futter- oder Lebensmittel, wie z. B. als synthetisches Fleischprodukt.

Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung werden im Folgenden unter Bezug auf die beigefügten Zeichnungen erläutert. Es zeigen:

25

Figur 1: ein Flussdiagramm zur Illustration einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens,

30

Figur 2: eine Illustration der Bildung primärer organoider Körper,

Figur 3: ein Flussdiagramm zur Illustration mit weiteren Einzelheiten des erfindungsgemäßen Verfahrens,

Figur 4: eine Darstellung der Bildung sekundärer organoider Körper,

Figur 5: eine Photographie eines Gewebekörpers,

5

Figur 6: ein Flussdiagramm mit weiteren Einzelheiten des erfindungsgemäßen Verfahrens,

Figur 7: eine Schemadarstellung zur Illustration der Kultivierung organoider Körper,

10

Figur 8: eine Schemadarstellung mit weiteren Einzelheiten einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens,

15

Figur 9: Illustrationen der Präparationsschritte gemäß verschiedenen Ausführungsformen der Erfindung, und

Figur 10: eine Illustration einer elektrischen Struktureinstellung an einer erfindungsgemäßen Materialzusammensetzung.

20

Zur erfindungsgemäßen Erzeugung einer Zusammensetzung aus biologischen Zellen und/oder Gewebe erfolgen gemäß Figur 1 zunächst eine Bereitstellung der von einem Donororganismus isolierten Stammzellen (Schritt 100), anschließend deren Aggregation zu organoiden Körpern (Schritt 200), die einer Differenzierung und/oder einem Wachstum (Schritt 300) und schließlich einer Sammlung und weiteren Bearbeitung (Schritt 400) unterzogen werden. Obwohl die Schritte 100 und 200 im Wesentlichen den erfindungsgemäßen Aggregationsschritt umfassen, während die Schritte 300 und 400 im Wesentlichen den erfindungsgemäßen Präparationsschritt repräsentieren und diese beiden Komplexe im Folgenden getrennt erörtert werden, wird

25

30

betont, dass Teilschritte der Präparation bereits im Rahmen der Aggregation erfolgen und umgekehrt Teilschritte der Aggregation erst im Rahmen der Präparation realisiert werden können. So kann bspw. die Differenzierung der organoiden Körper bereits im Rahmen der Aggregation beginnen, oder es können isolierte Stammzellen mit bereits vordifferenzierten organoiden Körpern aggregieren.

Die im Folgenden erläuterten Ausführungsformen der Erfindung beziehen sich beispielhaft auf die Erzeugung der biologischen Materialzusammensetzung aus Stammzellen, die Ratten oder Schweinen entnommen wurden. Die Umsetzung der Erfindung ist jedoch nicht auf diese Tierarten beschränkt. Vielmehr können die entsprechenden Verfahren an allen nicht-menschlichen Organismen mit differenzierten exokrinen Drüsen mit acinärem Gewebe realisiert werden, so z. B. mit Fischen, die acinäres Gewebe an der Pankreasdrüse besitzen, oder Säugetieren, wie zum Beispiel Rindern oder Schafen.

(I) Aggregation von Stammzellen aus differenziertem exokrinen Drüsengewebe eines tierischen Organismus zu organoiden Körpern und/oder Gewebekörpern

Entsprechend dem in Figur 2 dargestellten Schema wird zur Gewinnung der Zellen acinäres Gewebe - bevorzugt einer Speicheldrüse oder der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) - mechanisch und enzymatisch zerkleinert in Kultur genommen (Schritt 10 in Figur 2). Entgegen den Angaben von Bachem et al., Gastroenterol. 115:421-432 (1998), und Grosfils et al., Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 79:99-115 (1993), werden keine Gewebelöcke kultiviert, aus denen Zellen auswachsen sollen, sondern unter der Bedingung, dass die Zellverbände der Acini weitestgehend intakt bleiben, das Gewebe stärker zerkleinert.

Über mehrere Wochen werden diese Zellen und Zellverbände in Kulturgefäßen kultiviert. Alle 2 bis 3 Tage wird das Medium gewechselt, wobei alle differenzierten Zellen entfernt werden. Bei den in Kultur persistierenden Zellen handelt es sich
5 um undifferenzierte Zellen mit uneingeschränkter Teilungsfähigkeit.

Ähnliche Zellen sind unter gleichen Bedingungen aus dem Pankreas isoliert und beschrieben und als eine Art Myo-
10 fibroblasten bzw. pankreatische Sternzellen bezeichnet worden (Bachem et al., 1998). Im Gegensatz zu den Zellen der vorliegenden Erfindung konnte eine uneingeschränkte Teilungsfähigkeit jedoch nicht beobachtet werden. Weiterhin konnten diese Zellen auch nicht unbegrenzt passagiert werden, ohne an Vita-
15 lität zu verlieren.

In einem zweiten Schritt (12) werden ungefähr 400 bis 800 Zellen in je 20 µl Medium in hängenden Tropfen kultiviert. Dazu werden die Tropfen auf Deckel von bakteriologischen Pet-
20 rischalen gegeben, umgedreht und über die mit Medium gefüllte Petrischale gelegt, so dass die Tropfen nach unten hängen.

Durch diese Art der Kultivierung bilden sich innerhalb von 48h die als organoide Körper bezeichneten Zellaggregate (14),
25 die für ungefähr 6 Tage in eine Suspensionskultur umgesetzt werden (16). Die Teilansicht (18) aus Figur 2 zeigt eine mikroskopische Aufnahme eines solchen organoiden Körpers 2.

In Figur 3 sind die verschiedenen Möglichkeiten, organoide
30 Körper als Ausgangsmaterialien für die weitere Präparation bereitzustellen, mit weiteren Einzelheiten zusammengestellt. Nach der oben beschriebenen Kultivierung der isolierten Stammzellen im hängenden Tropfen (Schritt 210) erfolgt die Aggregation zu den so genannten primären organoiden Körpern

(Schritt 220), die direkt der Differenzierung und dem Wachstum (Schritt 300 in Figur 1) unterzogen werden können.

Alternativ erfolgt zunächst die Ablage der primären organoi-
den Körper auf einem Substrat zur Schaffung einer Adhäsions-
kultur (siehe auch Figur 4). Die Erfinder haben festgestellt,
dass die in Suspensionskultur wachsenden primären organoiden
Körper in Adhäsionskultur neue organoide Körper bilden kön-
nen. Auf dem Substrat folgt durch eine Zellwanderung die Bil-
dung einer Monoschicht (Schritt 240) und aus dieser die Ag-
gregation zu den so genannten sekundären organoiden Körpern
(Schritt 250). Diese können wiederum direkt der weiteren Dif-
ferenzierung und/oder dem Wachstum (Schritt 300) unterzogen
werden.

Die Bildung der sekundären organoiden Körper ist auch in Fi-
gur 4 illustriert. Die primären organoiden Körper 2 bilden
auf dem Substrat der Adhäsionskultur, wie z. B. auf dem Boden
der Kulturschale 20, durch ein Wandern oder Wachsen von Zel-
len 3 zunächst eine Monoschicht, aus der dann die sekundäre
organoide Körper 4 herauswachsen. Mit der Kultivierung der
primären organoiden Körper 2 zu sekundären organoiden Körpern
4 wird eine weitere Vervielfältigung des Biomaterials ge-
schaffen.

Aus jedem der primären oder sekundären organoiden Körper 2, 4
können bei weiterer Kultivierung Gewebekörper wachsen. Figur
5 zeigt beispielhaft einen in der Adhäsionskultur gewachsenen
Gewebekörper 5 (der weiße Strich entspricht einer Länge von 2
mm im Original).

Ausführungsbeispiele für die Isolierung und Aggregation von Stammzellen

In den folgenden, nicht-beschränkenden Beispielen wird die Isolierung und Aggregation von Stammzellen näher erläutert.

Die allgemeinen Arbeitsanweisungen, wie sie für Verfahren zur Kultivierung von tierischen Zellen und insbesondere von Säugetierzellen gebräuchlich sind, sind zu beachten. Eine sterile Umgebung, in der das Verfahren durchgeführt werden soll, ist - auch wenn hierzu keine weitere Beschreibung erfolgt - in jedem Fall einzuhalten. Folgende Puffer und Medien wurden verwendet:

15	<u>HEPES-Stammlösung (pH 7,6)</u>	2,3 83 g HEPES auf 100 ml A. bidest.
	<u>HEPES-Eagle-Medium (pH 7,4)</u>	90 ml Modified Eagle Medium (MEM)
		10 ml HEPES-Stammlösung
	<u>Isolationsmedium (pH 7,4)</u>	32 ml HEPES-Eagle-Medium
		8 ml 5% BSA in A. bidest.
20		300 µl 0,1 M CaCl ₂
		100 µl Trasylol (200.000 KIE)
	<u>Digestionsmedium (pH 7,4)</u>	20 ml Isolationsmedium
		4 ml Kollagenase (Kollagenase NB 8 von Serva)
	<u>Inkubationsmedium</u>	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
25	<u>Nährmedium</u>	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
		DMEM + 4500 mg/l Glucose
		+ L-Glutamin
		- Pyruvat
		+ 20 % FKS (inaktiviert) + 1 ml/100 ml Pen/Strep
30		(10000 E/10000 µg/ml)
		oder
		DMEM + 10 % Eigenplasma + 1 ml/100 ml
		Pen/Strep, vor Gebrauch auf 37°C erwärmen

	Differenzierungsmedium	380 ml DMEM
		95 ml 30 min bei 54 °C inaktiviertes FKS
		5 ml Glutamin (GIBCO BRL)
		5 ml (3,5 µl β -Mercaptoethanol auf 5 ml PBS)
5		5 ml Non-essential amino acids (GIBCO BRL)
		5 ml Penicillin/Streptomycin (GIBCO BRL)
		(10000 E/10000 µg/ml)

10 Statt fötalem Kalbserum (FKS) im Nährmedium und Differenzierungsmedium kann gegebenenfalls auch Eigenplasma oder, weniger bevorzugt, Eigenserum des Gewebedonors verwendet werden.

15 Das Nährmedium kann als Basismedium statt des verwendeten DMEM-Mediums auch ein anderes für die Kultivierung von eukaryotischen Zellen, insbesondere Säugerzellen, bekanntes, geeignetes Basismedium enthalten, in dem die differenzierten Zellen absterben und sich die gewünschten Stammzellen vermehren. Auch Isolationsmedium, Inkubationsmedium und Differenzierungsmedium können ein anderes übliches und geeignetes Basismedium enthalten.

20

Die folgenden Beispiele 1 und 2 beschreiben detailliert zwei Arbeitsprotokolle zur Isolierung und Kultivierung adulter pluripotenter Stammzellen aus acinärem Gewebe des Pankreas.

25 Beispiel 3 beschreibt ein entsprechendes Protokoll für die Isolierung aus acinärem Gewebe der Speicheldrüse.

BEISPIEL 1

1. Präparation des Gewebes und Isolierung der Zellen

30 In den *Ductus pancreaticus* von 2-3 Jahre alten Ratten werden mittels einer Spritze und einer stumpfen Kanüle bei der Ratte 10 ml Digestionsmedium langsam und luftblasenfrei injiziert. Das gesamte Pankreas wird dadurch aufgeblasen und kann so besser herauspräpariert werden. Das Pankreas wird dann in ein

Becherglas überführt und weitere 5 ml Digestionsmedium dazugegeben. Nachdem man das Fettgewebe und Lymphknoten entfernt hat, wird das Gewebe im Becherglas mit einer feinen Schere sehr fein zerkleinert, oben schwimmendes Fettgewebe abgesaugt und die Suspension wird abschließend 1 min mit Carbogen begast (wenn nötig wiederholen) und für 20 min bei 37 °C mit Alufolie bedeckt in einem Schüttler bei 200 Zyklen/min inkubiert. Danach saugt man das Medium vorsichtig ab, zerkleinert erneut mit einer Schere das Gewebe und wäscht die Gewebestücke zweimal mit je 10 ml Isolationsmedium und gibt wieder 5 ml Digestionsmedium zum Gewebe hinzu.

Nach erneutem Begasen mit Carbogen für etwa 1 min und Inkubation für 15 min bei 37 °C in einem Schüttler bei 200 Zyklen/min werden die Gewebestücke durch sukzessives Aufziehen in jeweils einer 10 ml, 5ml, 2 ml und 1 ml Glaspipette zerkleinert und durch einlagiges Filtergewebe gepresst. Die so vereinzelter Zellen werden nun fünfmal in Inkubationsmedium gewaschen (37 °C), mit Carbogen begast und jedes Mal 5 min bei 90 g zentrifugiert. Das zuletzt erhaltene Pellet wird in Inkubationsmedium resuspendiert, begast und auf Gewebekulturschalen verteilt.

2. Kultivierung der Zellen

Die Gewebekulturschalen mit den isolierten Zellen werden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Alle 2-3 Tage wird das Medium gewechselt. Dabei werden alle differenzierten Zellen entfernt.

Am siebenten Tag in Kultur werden die Zellen mit einer Lösung bestehend aus 2 ml PBS, 1 ml Trypsin und 2 ml Inkubationsmedium passagiert. Dabei lösen sich die Zellen vom Boden der Kulturschale. Die Zellsuspension wird 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 2 ml Inkuba-

tionsmedium resuspendiert, auf eine mittlere Zellkulturflasche überführt und 10 ml Inkubationsmedium dazugegeben. Der Medienwechsel erfolgt alle drei Tage.

- 5 Am vierzehnten Tag in Kultur werden die Zellen erneut, aber diesmal mit 6 ml PBS, 3 ml Trypsin und 6 ml Inkubationsmedium, passagiert. Die Zellsuspension wird 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 6 ml Inkubationsmedium resuspendiert, auf 3 mittlere Zellkulturflaschen
10 überführt und jeweils 10 ml Inkubationsmedium dazugegeben.

Die Zellen werden weiter kultiviert und so oft passagiert und ausgesät, bis die Zellen einen semikonfluenten bis konfluenten Zustand erreichen.

15

BEISPIEL 2

- Pankreas-Acini wurden von männlichen Sprague-Dawley-Ratten (20-300 g) erhalten, die narkotisiert (CO₂) und über die dorsale Aorta ausgeblutet worden waren. Eine Kanüle wurde transduodenal in den Pankreasgang eingeführt und dem Pankreas wurde von hinten 10 ml Digestionsmedium, enthaltend HEPES-Eagle-Medium (pH 7,4), 0,1 mM HEPES-Puffer (pH, 7,6), 70%
20 (Vol./Vol.) modifiziertes Eagle-Medium, 0,5 % (Vol./Vol.) Trasyolol (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland), 1 % (Gew./Vol.) Rinderserumalbumin), 2,4 mM CaCl₂ und Kollagenase (0,63 P/mg,
25 Serva, Heidelberg, Deutschland) injiziert.

- Vor der Entfernung wurde der Pankreas von anhaftendem Festgewebe, Lymphknoten und Blutgefäßen teilweise befreit. Dann
30 wurde gesundes Pankreasgewebe in Digestionsmedium abgeholt (bei 20 °C, geringerer Stoffwechsel), das Pankreasgewebe mit einer Schere sehr fein zerkleinert, oben schwimmendes Fettgewebe abgesaugt und die Gewebesuspension mit Carbogen (Messer, Krefeld, Deutschland) begast, ohne dass die Düse in das Medi-

um mit den Zellen gelangt (Verringerung von mechanischem Streß) und damit auf pH 7,4 eingestellt. Danach wurde die Suspension in einem 25-ml-Erlenmeyerkolben (mit Alufolie bedeckt) unter konstantem Schütteln (150-200 Zyklen pro Minute) bei 37 °C in 10 ml Digestionsmedium inkubiert. Nach 15-20 Minuten wurde das oben schwimmende Fett und das Medium abgesaugt und das Gewebe wurde erneut zerkleinert und mit Medium ohne Kollagenase gespült (Vorgang mindestens zweimal wiederholen, vorzugsweise solange bis Zellfraktion transparent), worauf Digestionsmedium zugegeben und erneut etwa 1 Minute lang mit Carbogen begast wurde. Es folgte wiederum eine Digestion mit Kollagenase für 15 Minuten bei 37°C im Schüttler unter Verwendung desselben Puffers. Nach der Digestion wurden die Acini durch sukzessives Hochziehen und Ausstossen durch 10 ml-, 5 ml und 2 ml-Glaspipetten mit engen Öffnungen dissoziiert und durch ein einlagiges Nygonsieb (Polymon PES-200/45, Angst & Pfister AG, Zürich, Schweiz) mit einer Maschengröße von etwa 250 µm filtriert. Die Acini wurden zentrifugiert (bei 37°C und 600-800 UpM in einer Beckman-GPR-Zentrifuge, entspricht etwa 90 g) und weiter gereinigt durch Waschen in Inkubationsmedium, enthaltend 24,5 mM HEPES (pH 7,5), 96 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2,5 mM NaH₂PO₄, 0, mM CaCl₂, 11,5 mM Glucose, 5 mM Natriumpyruvat, 5 mM Natriumglutamat, 5 mM Natriumfumarat, 1 % (Vol./Vol.) modifiziertes Eagle-Medium, 1 % (Gew./Vol.) Rinderserumalbumin, mit Carbogen äquilibriert und auf pH 7,4 eingestellt. Die Waschprozedur (Zentrifugation, Absaugen, Resuspension) wurde fünfmal wiederholt. Soweit nicht anders angegeben, wird bei der obigen Isolierung bei etwa 20 °C gearbeitet.

30

Die Acini wurden in Inkubationsmedium resuspendiert und bei 37°C in einer angefeuchten Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Das acinäre Gewebe starb dabei schnell (innerhalb von zwei Tagen) ab und die sterbenden differenzierten Zellen lösten

sich dabei von den benachbarten Zellen, ohne diese zu schädigen (schonende Isolierung), die nicht absterbenden Stammzellen sanken zu Boden und hefteten sich an. Die differenzierten Aciniszellen sind dazu nicht in der Lage. Das Inkubationsmedium wurde am zweiten oder dritten Tag nach dem Aussäen erstmals gewechselt, wobei ein Großteil der frei schwimmenden Acini und acinären Zellen entfernt wurde. Zu diesem Zeitpunkt hatten sich die ersten Stammzellen bzw. deren Vorläufer am Boden festgesetzt und begannen sich zu teilen. Der Mediumwechsel wurde danach an jedem dritten Tag wiederholt und differenzierte acinäre Pankreaszellen wurden bei jedem Mediumwechsel entfernt.

Am siebenten Tag in Kultur wurden die Zellen mit einer Lösung bestehend aus 2 ml PBS, 1 ml Trypsin (+ 0,05 % EDTA) und 2 ml Inkubationsmedium passagiert. Dabei lösen sich die Zellen vom Boden der Kulturschale. Die Zellsuspension wurde 5 Minuten bei etwa 1000 UpM (Beckmann GPR-Zentrifuge) zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 2 ml Inkubationsmedium resuspendiert, auf eine mittlere Zellkulturflasche überführt und 10 ml Inkubationsmedium dazugegeben.

Am vierzehnten Tag in Kultur wurden die Zellen erneut, aber diesmal mit 6 ml PBS, 3 ml Trypsin/EDTA und 6 ml Inkubationsmedium, passagiert. Die Zellsuspension wird 5 Minuten bei 1000 UpM zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 6 ml Inkubationsmedium resuspendiert, auf 3 mittlere Zellkulturflaschen überführt und jeweils 10 ml Inkubationsmedium dazugegeben.

Am Tag 17 erfolgte ein drittes Passagieren auf insgesamt 6 mittlere Zellkulturflaschen und am Tag 24 ein viertes Passagieren auf insgesamt 12 mittlere Zellkulturflaschen. Spätes-

tens jetzt waren alle primären Zellen bis auf die Stammzellen aus der Zellkultur entfernt.

Die Stammzellen können weiter kultiviert werden und so oft
5 passagiert und ausgesät wie gewünscht. Das Aussäen erfolgt vorzugsweise jeweils in einer Dichte von $2-4 \times 10^5$ Zellen/cm² in Inkubationsmedium.

BEISPIEL 3

10 Die Isolierung und Kultivierung aus exokrinem Gewebe der Ohrspeicheldrüse erfolgte analog dem Pankreas-Protokoll mit den folgenden Abweichungen:

1. Das exokrine Gewebe der Ohrspeicheldrüse war eine Mischung von acinärem Gewebe und tubulösem Gewebe.
- 15 2. Nachdem Speicheldrüsen weniger Proteasen und Amylasen als Pankreas enthalten, ist es möglich, das Speicheldrüsengewebe vor der Aufarbeitung einige Zeit im Kühlschrank bei etwa 4°C aufzubewahren, ohne dass das Gewebe zu sehr geschädigt wird. Im konkreten Beispielsfall betrug die Aufbewahrungszeit 15 h
20 und brachte keine nachteiligen Folgen für die Isolierung der gewünschten Stammzellen mit sich.

Die folgenden Beispiele 4 und 5 beschreiben detailliert zwei Arbeitsprotokolle zur Herstellung von organoiden Körpern und
25 differenzierten Zellen.

BEISPIEL 4

Die undifferenzierten Zellen werden mit einer Lösung aus 10 ml PBS, 4 ml Trypsin, 8 ml Differenzierungsmedium abtrypsi-
30 niert und 5 Minuten abzentrifugiert. Das resultierende Pellet wird so in Differenzierungsmedium resuspendiert, dass sich eine Verdünnung von 3000 Zellen je 100 µl Medium einstellt. Anschließend werden die Zellen nochmals gut mit einer 3 ml Pipette suspendiert.

Von bakteriologischen Petrischalen, die vorher mit jeweils 15 ml PBS (37 °C) pro Platte beschichtet worden sind, wird der Deckel abgenommen und umgedreht. Mit Hilfe einer automatischen Pipette werden auf einen Deckel ca. fünfzig 20 µl Tropfen gegeben. Der Deckel wird dann schnell umgedreht und auf die mit Differenzierungsmedium gefüllte Petrischale gegeben, sodass die Tropfen nach unten hängen. Die Petrischalen werden anschließend vorsichtig in den Brutschrank gestellt und für 48 h inkubiert.

Daraufhin werden die in den hängenden Tropfen aggregierten Zellen, die hier organoide Körper genannt werden, aus jeweils vier Deckeln in je eine bakteriologische Petrischale mit 5 ml Inkubationsmedium mit 20 % FKS überführt und für weitere 96 h kultiviert.

Die organoide Körper werden nun vorsichtig mit einer Pipette aufgesammelt, und in mit 0,1 % Gelatine beschichtete Zellkulturgefäße mit Differenzierungsmedium überführt. In einer besonders bevorzugten Ausgestaltung des Verfahrens verwendet man als Kulturgefäß mit 0,1 % Gelatine beschichtete 6 cm Petrischalen, in die 4 ml Differenzierungsmedium vorgelegt wurde und die anschließend mit je 6 organoiden Körpern beschickt werden. Ein weiteres bevorzugtes Kulturgefäß sind mit 0,1 % Gelatine beschichtete Chamber Slides, in die 3 ml Differenzierungsmedium vorgelegt wurde und die anschließend mit je 3-8 organoiden Körpern beschickt werden. Daneben können auch 24-Mulden-Mikrotiterplatten verwendet werden, die mit 0,1 % Gelatine beschichtet wurden und in die je 1,5 ml pro Mulde Differenzierungsmedium vorgelegt wurde und anschließend mit je 4 organoiden Körpern beschickt werden.

Derart kultiviert, ist die Differenzierungsfähigkeit der Zellen in den organoide Körper aktiviert und die Zellen differenzieren sich in Zellen der drei Keimblätter Mesoderm, Entoderm und Ektoderm. Die Zellen können sowohl als organoide Körper als auch als einzelne Zellen gelagert und kultiviert werden und behalten ihre Pluripotenz.

BEISPIEL 5

Für die Induktion der Differenzierung wurden vorzugsweise Stammzellen nach dem 42. Tag der Kultivierung verwendet. Die Verwendung von Stammzellen nach der 3. oder 4. Passage oder von Zellen, die bei der Temperatur von flüssigem Stickstoff 12-18 Monate lang gelagert worden waren, war ebenfalls problemlos möglich.

Zunächst wurden die Zellen in Differenzierungsmedium mit der oben angegebenen Zusammensetzung überführt und auf eine Dichte von etwa 3×10^4 Zellen/ml eingestellt; z.B. durch Trypsinbehandlung einer Stammzellkultur in Nährmedium, 5-minütige Zentrifugation bei 1000 UpM und Resuspendieren des Pellets in Differenzierungsmedium und Verdünnung soweit erforderlich.

Anschließend wurden mit einer 20- μ l Pipette ca. 50 20- μ l-Tropfen (600 Zellen/20 μ l) auf die Innenseite des Deckels einer bakteriologischen Petrischale gegeben (gestopfte Spitzen) und die Deckel vorsichtig auf die mit PBS gefüllten Petrischalen gestülpt, sodass die Tropfen nach unten hängen. Für jeden Deckel wurde eine neue Spitze verwendet. Die Petrischalen wurden anschließend vorsichtig in den Brutschrank gestellt und 48 h lang bei 37°C inkubiert.

Danach wurden die in den hängenden Tropfen aggregierten Zellen, die organoide Körper (OB), aus jeweils vier Deckeln in

je eine bakteriologische Petrischale mit 5 ml Inkubationsmedium mit 20 % FKS überführt (Deckel schräg halten und die OBs mit etwa 2,5 ml Nährmedium abspülen) und für weitere 5-9 Tage, vorzugsweise 96 h, kultiviert.

5

Die organoiden Körper wurden nun vorsichtig mit einer Pipette aufgesammelt und in mit 0,1 % Gelatine beschichtete Zellkulturgefäße mit Differenzierungsmedium überführt. Die OB vermehrten sich nun und wuchsen in zum Teil einzelnen Zellkolonien, die wieder vermehrt vereinzelt und vermehrt werden konnten. In einer besonders bevorzugten Ausgestaltung des Verfahrens wurden als Kulturgefäß mit 0,1 % Gelatine beschichtete 6 cm Petrischalen verwendet, in die 4 ml Differenzierungsmedium vorgelegt worden war, und diese mit je 6 organoiden Körpern beschickt. Ein weiteres bevorzugtes Kulturgefäß waren mit 0,1 % Gelatine beschichtete Chamber Slides, in die 3 ml Differenzierungsmedium vorgelegt wurde und die anschließend mit je 3-8 organoiden Körpern beschickt wurden und Thermanox-Platten (Nalge Nunc International, USA) für elektronenmikroskopische Studien. Ein weitere Alternative waren 24-Mulden-Mikrotiterplatten, die mit 0,1 % Gelatine beschichtet wurden und in die je 1,5 ml pro Mulde Differenzierungsmedium vorgelegt wurde und die anschließend mit je 4 organoiden Körpern beschickt wurden.

25

In einer bevorzugten Ausgestaltung des Verfahrens wurden OBs etwa 7 Wochen lang in den gelatine-beschichteten 6-cm-Petrischalen kultiviert und danach wurden einzelne OBs mit dem Microdissector (Eppendorf, Hamburg, Deutschland nach den Anweisungen des Herstellers ausgeschnitten und dann z.B. auf frische 6-cm-Petrischalen, Chamber Slides oder Thermanox-Platten überführt.

30

(II) Präparation der Materialzusammensetzung aus den organoi-
den Körpern und/oder Gewebekörpern

Allgemein können die Schritte der Sammlung und weiteren Bear-
5 beitung (Schritt 400) die in Figur 6 gezeigten Teilschritte
umfassen. Gemäß Teilschritt 410 erfolgt die Sammlung („Ern-
ten“) von organoiden Körpern oder Gewebekörpern mit ggf. ver-
schieden differenzierten Zelltypen (Schritt 410). Anschlie-
ßend werden die verschiedenen Zelltypen in dem gewünschten
10 Kompositverhältnis gemischt (Schritt 420). Schließlich er-
folgt die Formgebung, Verdichtung und/oder Strukturbildung am
Verbund (Schritt 430).

Die Bereitstellung der verschieden differenzierten Zelltypen
15 ist beispielhaft in Figur 7 gezeigt. Bei dieser Variante des
erfindungsgemäßen Verfahrens werden die organoiden Körper 2
unter der Wirkung vordifferenzierter Einzelzellen einer Dif-
ferenzierung unterzogen. Hierzu werden aus den primär iso-
lierten Stammzellen 1 zunächst differenzierte Stammzellen 1a
20 gebildet (Pfeil A). Die differenzierten Stammzellen 1a umfas-
sen zum Beispiel Muskelzellen. Parallel werden aus den primä-
ren isolierten Stammzellen 1 entsprechend den oben genannten
Prinzipien in hängenden Tropfen organoide Körper 2 gebildet
(Pfeil B). Die Muskelzellen 1a werden in die hängenden Trop-
25 fen zugefügt (siehe vergrößertes Teilbild), wo sie eine Dif-
ferenzierung der organoiden Körper 2 zu Muskelzellen auslö-
sen.

Ein Verfahrensweg zur erfindungsgemäßen Erzeugung einer
30 fleischartigen Gewebezusammensetzung 6 ist schematisch in Fi-
gur 8 illustriert. Die primär isolierten Stammzellen 1 umfas-
sen eine wiederholt vermehrbare, nach den oben beschriebenen
Prinzipien gewonnene Stammzellenkultur mit pluripotenten,
mindestens jedoch multipotenten Zellen. Ausgehend von den

primär isolierten Stammzellen 1 erfolgt zunächst die Bereitstellung von Suspensionskulturen und die Kultivierung im hängenden Tropfen (siehe Figur 3, Schritt 210). In Figur 8 sind beispielhaft drei Suspensionskulturen gezeigt, die im weiteren Verfahren zu verschiedenen Zelltypen führen, die am Ende zu dem gewünschten Komposit 6 zusammengefügt werden sollen. In der ersten Suspensionskultur (Pfeil A) werden bspw. organoide Körper 2a aus Muskelzellen erzeugt, während in den übrigen Suspensionskulturen (Pfeile B und C) z. B. organoide Körper 2b aus Fettzellen und 2c aus Bindegewebezellen erzeugt werden. Auf jedem der Pfade A, B und C werden jeweils einige bis zu einigen Hundert oder sogar einigen Tausend Stammzellen 1 in die hängende Tropfenkultur überführt. Zur Bildung der Tropfenkultur werden verschiedene Kultivierungsmedien verwendet, die zum Beispiel molekulare Differenzierungsfaktoren oder differenzierte Zellen (siehe Figur 7) enthalten. Die Tropfengröße wird durch die Schaffung einer gesättigten Atmosphäre in der Umgebung der Tropfenkultur oder in an sich bekannter Weise durch die Zuführung eines weiteren Kulturmediums konstant gehalten.

Nachdem die organoiden Körper 2a, 2b, 2c gebildet sind und einen Durchmesser von z. B. einigen Hundert Mikrometern besitzen, werden die organoiden Körper in die Kulturschalen 20 in Adhäsionskulturen überführt. Dort erfolgt ein weiteres Wachstum zu Gewebekörpern 5a, 5b und 5c. Da die Kultivierungsmedien in den Kulturschalen 20 verschiedene Signalfaktoren enthalten, besitzen die Gewebekörper 5a, 5b und 5c entsprechend differenziertes Gewebe. Alternativ kann ein Wachstum mit einem Zelltypengemisch vorgesehen sein.

Wenn die Gewebekörper 5a, 5b und 5c eine Größe von z. B. einigen Millimetern erreicht haben, werden Sie gesammelt (Schritt 400, siehe auch Figur 1) und zusammengefügt, so dass

ein lockerer Verbund mit einer vorbestimmten quantitativen Zusammensetzung der Gewebekörper 5a, 5b und 5c entsteht. Dieser wird dann mit Hilfe von mechanischen Druckkräften, Ultraschall, mechanischen Vibrationen in die gewünschte Materialzusammensetzung des Komposits 6 überführt. Hierzu werden dem Verbund ggf. Vernetzungsmittel, wie z. B. Gele, Kollagenfasern, Geschmacksstoffe, Lebensmittelfarbstoffe oder dgl. zugesetzt.

Das Komposit 6 besitzt typische Dimensionen von beispielsweise einigen 100 µm bis einige mm, kann aber auch größer sein. Bei der Herstellung von Lebensmitteln kann eine Vielzahl von Kompositen zur gewünschten Größe kombiniert werden.

Figur 9 illustriert schematisch die Formgebung des erfindungsgemäß hergestellten biologischen Komposits am Beispiel von verschiedenen Verfahrensvarianten.

Gemäß einer ersten Variante (Pfeil A) werden eine Vielzahl von organoiden Körper 2 oder entsprechend gewachsenen Gewebekörper in eine Prägeeinrichtung eingelegt, die bei diesem Beispiel durch ein Kultivierungssubstrat 21 mit einer vorgegebenen Oberflächenstruktur gebildet wird. Auf dem strukturierten Kultivierungssubstrat 21 erfolgt ein Wachstum und die Vermehrung des Zellmaterials. Dabei kann durch Oberflächenimmobilisierte, molekulare Wachstumsfaktoren (z. B. Proteine) eine bestimmte Differenzierung während des Zellwachstums induziert werden. Wenn die Oberflächenstruktur des Kultivierungssubstrats 21 ausgefüllt ist, kann das Komposit 6 entnommen werden und ggf. weiter geformt oder mit anderen Kompositen zusammengesetzt werden (Teilbild links unten).

Bei der alternativen Variante (Pfeil B) werden die organoiden Körper auf ein Trägersubstrat 22 in Form einer dreidimensionalen Matrice aufgebracht. Diese besteht aus verdaubaren

Stoffen, wie z. B. Polymeren, Biopolymeren oder dgl.. Beim Wachstum wandern die Zellen des organoiden Körpers 2 in die Trägereinrichtung 22 ein. Entsprechend können mit band-
streifen- oder schichtförmigen Trägereinrichtung verschiedene
5 Grundbausteine geschaffen werden, die zu einem größeren Komposit 6 zusammenfügbar sind (Teilbild rechts unten).

Figur 10 zeigt beispielhaft die Struktureinstellung an einem schichtförmigen Trägersubstrat 22, die analog zur Variante B
10 in Figur 9 mit organoiden Körpern oder Gewebekörpern bewachsen ist, die vorrangig aus Muskelzellen bestehen. Wenn das Trägersubstrat 22, das bspw. ein dreidimensionales Kollagen-Vlies aus autologem Kollagen umfasst, vollständig durchdrungen und bewachsen ist, wird das Komposit 6 einem Strompuls
15 ausgesetzt. Daraufhin kontrahieren die Muskelzellen im Komposit 6 entgegen den Kräften der Kollagenmatrix. Es wird eine innere Spannung eingestellt, die mit einer erhöhten Festigkeit des Komposits verbunden ist.

20 Die in der vorstehenden Beschreibung, den Ansprüchen und den Zeichnungen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln oder auch in Kombination für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausgestaltungen von Bedeutung sein.

PATENTANSPRÜCHE

5. 1. Verfahren zur Herstellung einer biologischen Material-
zusammensetzung tierischen, nicht-menschlichen Ursprungs,
insbesondere als Futter- oder Lebensmittel, umfassend:
- Aggregation von Stammzellen aus differenziertem exokrinen
Drüsengewebe eines tierischen Organismus zu organoiden Kör-
10 pern, und
- Präparation der Materialzusammensetzung aus den organoiden
Körpern.
2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die Aggregation der
15 Stammzellen in einem Kulturmedium ohne einen Zusatz erfolgt,
der eine Differenzierung von Zellen beeinflusst.
3. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die Aggregation der
Stammzellen in einem Kulturmedium erfolgt, das mindestens ei-
20 nen Zusatz enthält, der eine Differenzierung der Stammzellen
bei der Aggregation beeinflusst.
4. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden An-
sprüche, bei dem die Aggregation von Stammzellen zu primären
25 organoiden Körpern führt, wobei die Präparation der Material-
zusammensetzung eine Bildung von sekundären organoiden Kör-
pern aus den primären organoiden Körpern umfasst.
5. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden An-
30 sprüche, bei dem die Präparation der Materialzusammensetzung
ein Wachstum der organoiden Körper zu Gewebekörpern umfasst.
6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, bei dem die Bildung
der sekundären organoiden Körper und/oder das Wachstum zu Ge-

webekörpern in einem Kulturmedium ohne einen Zusatz erfolgt, der eine Differenzierung von Zellen beeinflusst.

7. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, bei dem die Bildung
5 der sekundären organoiden Körper und/oder das Wachstum zu Gewebekörpern in einem Kulturmedium erfolgt, das mindestens einen Zusatz enthält, durch den sich eine Mehrzahl der zu einem organoiden Körper oder Gewebekörper gehörenden Zellen zu einem bestimmten Zelltyp differenziert.
- 10 8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 3 bis 7, bei dem die Differenzierung zu mindestens einem der folgenden Zelltypen vorgesehen ist: Muskelzellen, Knorpelzellen, Bindegewebezellen, Fettzellen und Enzym-produzierende Zellen.
- 15 9. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 3 bis 8, bei dem die Differenzierung durch einen Zusatz von differenzierten Zellen beeinflusst wird.
- 20 10. Verfahren nach Anspruch 9, bei dem die Differenzierung durch einen Zusatz von differenzierten autologen Zellen beeinflusst wird.
- 25 11. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem bei der Präparation der Materialzusammensetzung wenigstens ein Teil der Zellen in den organoiden Körpern oder Gewebekörpern lebende Zellen sind.
- 30 12. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 10, bei dem bei der Präparation der Materialzusammensetzung die Zellen in den organoiden Körpern oder Gewebekörpern in einem toten Zustand sind.

13. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Präparation der Materialzusammensetzung ein Zusammenfügen der organoiden Körper oder der Gewebekörper zu einem Komposit umfasst.

5

14. Verfahren nach Anspruch 13, bei dem beim Zusammenfügen eine Vielzahl von organoiden Körpern oder Gewebekörpern wenigstens einem der folgenden Schritte unterzogen werden:

- Zusammenwachsen,
- 10 - gegenseitiges adhärentes Anhaften,
- Verdichten, und
- Laden auf oder in eine Trägereinrichtung.

15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, bei dem das Komposit nach dem Zusammenfügen weiter wächst.

15

16. Verfahren nach Anspruch 15, bei dem bei der Präparation die Form des Komposits durch dessen Wachstum eingestellt wird.

20

17. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem bei der Präparation die Form des Komposits durch die Form einer Prägeeinrichtung eingestellt wird.

25 18. Verfahren nach Anspruch 17, bei dem als Prägeeinrichtung ein Kultivierungssubstrat, eine Prägeoberfläche oder ein flexibler Behälter verwendet wird.

19. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem bei der Präparation eine innere Struktur der Materialzusammensetzung eingestellt wird.

30

20. Verfahren nach Anspruch 19, bei dem die Struktur der Materialzusammensetzung durch eine Einwirkung eines elektrischen Stroms eingestellt wird.
- 5 21. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 20, bei dem das Komposit aus verschiedenen differenzierten organoiden Körpern oder aus Gewebekörpern zusammengefügt wird, die jeweils aus verschiedenen differenzierten organoiden Körpern gewachsen sind.
- 10 22. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem ein Zusatz von Geschmacksstoffen vorgesehen ist.
- 15 23. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Stammzellen aus Drüsengewebe eines Wirbeltieres isoliert werden.
- 20 24. Verfahren nach Anspruch 23, bei dem die Stammzellen aus Drüsengewebe eines Fisches, eines Vogels oder eines nicht-menschlichen Säugetieres isoliert werden.
- 25 25. Biologische Materialzusammensetzung, die durch ein Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche hergestellt ist.
26. Verwendung einer Materialzusammensetzung nach Anspruch 25 als Futter oder Lebensmittel.
- 30 27. Verwendung einer Materialzusammensetzung nach Anspruch 25 zur Herstellung eines synthetischen Fleischprodukts.

1/5

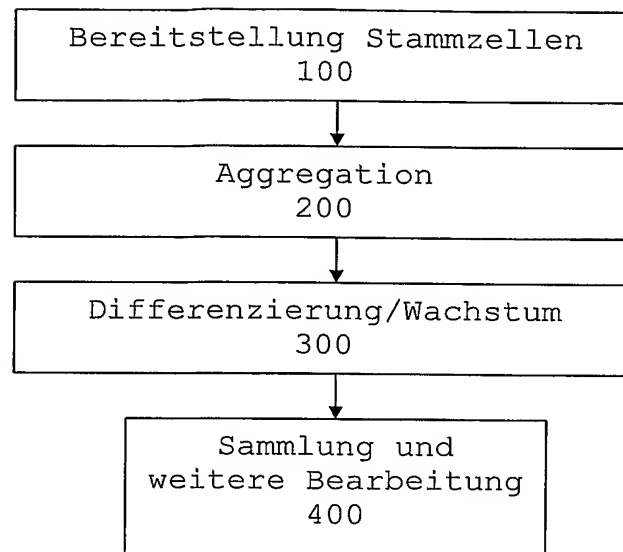


FIG. 1

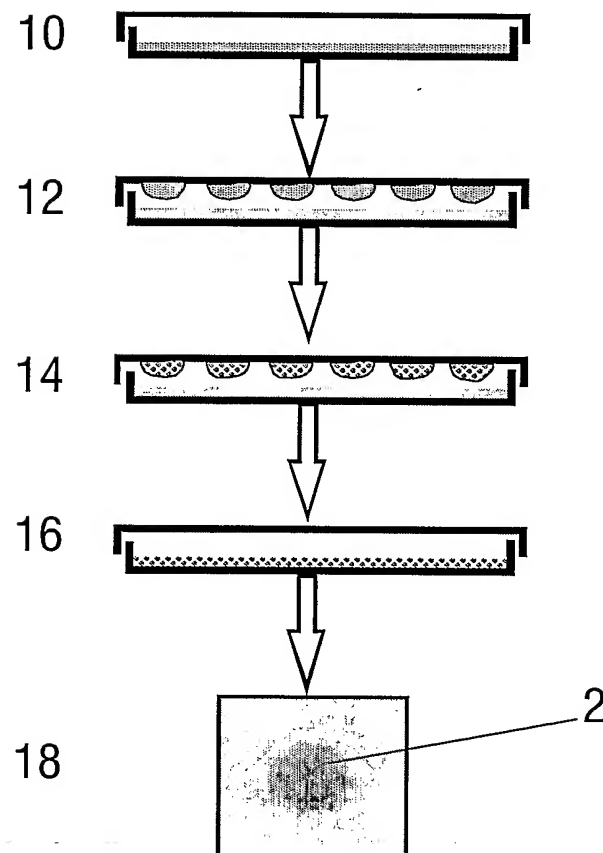
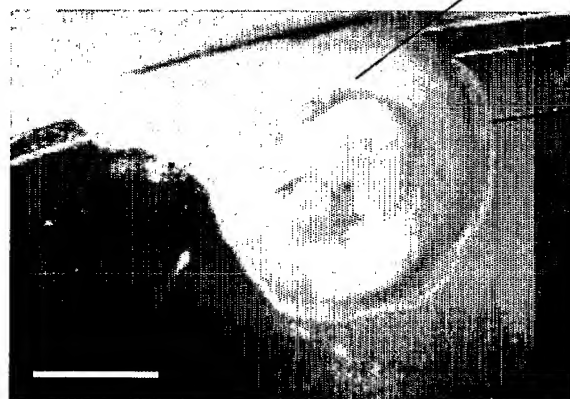
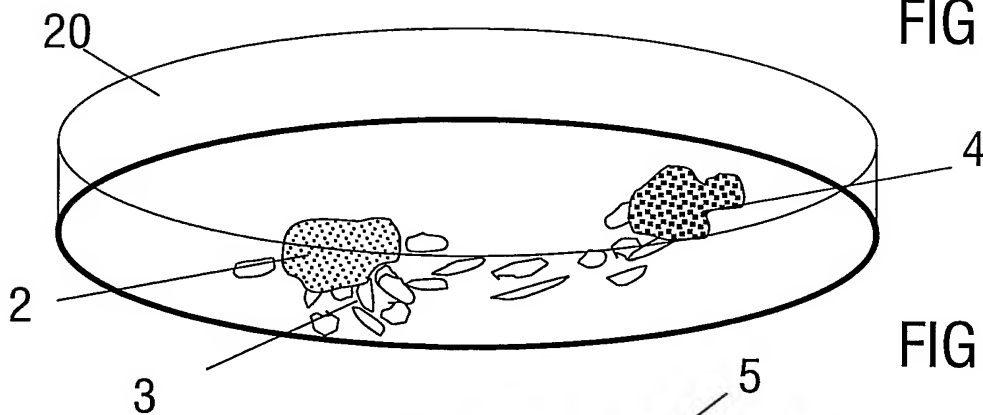
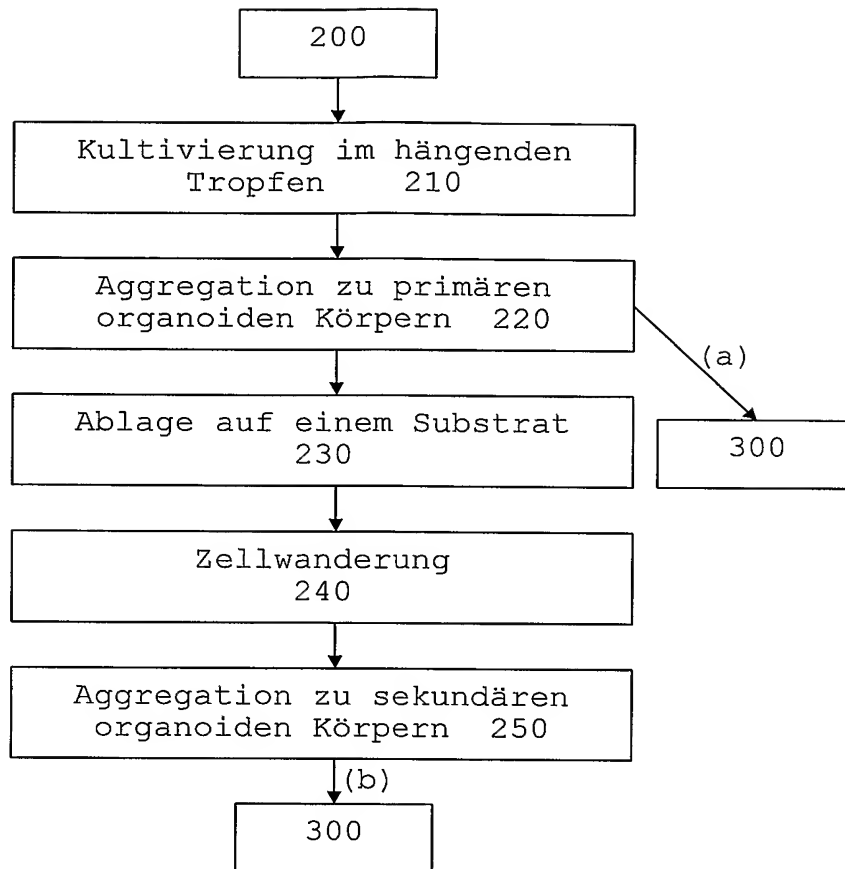


FIG. 2

2/5



3/5

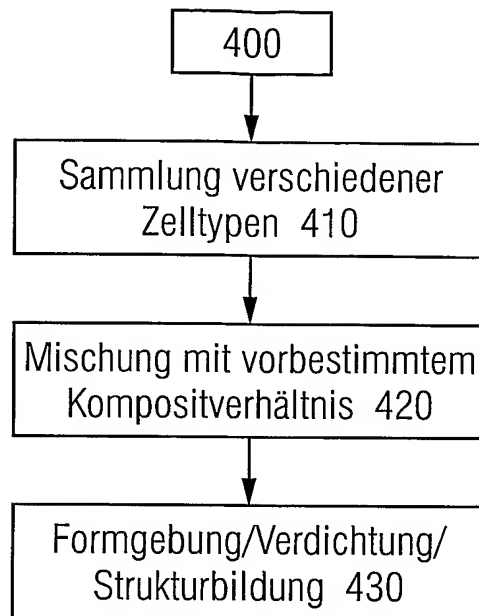


FIG. 6

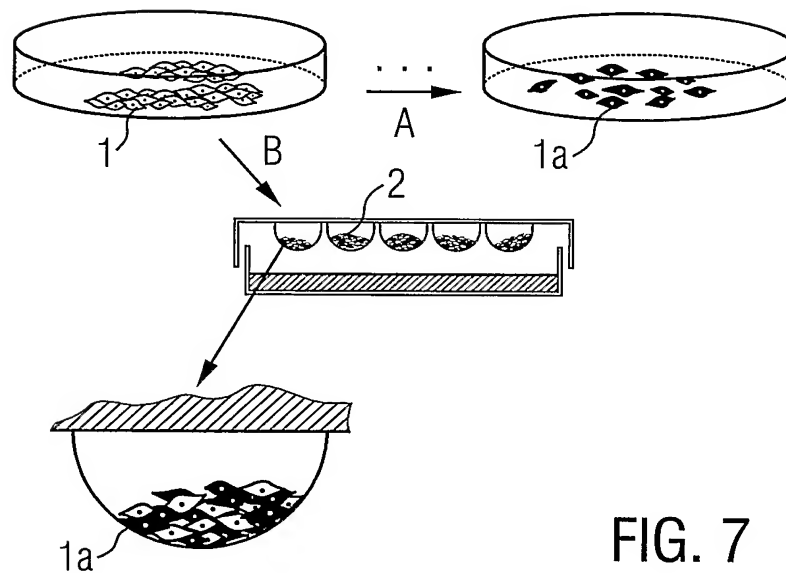
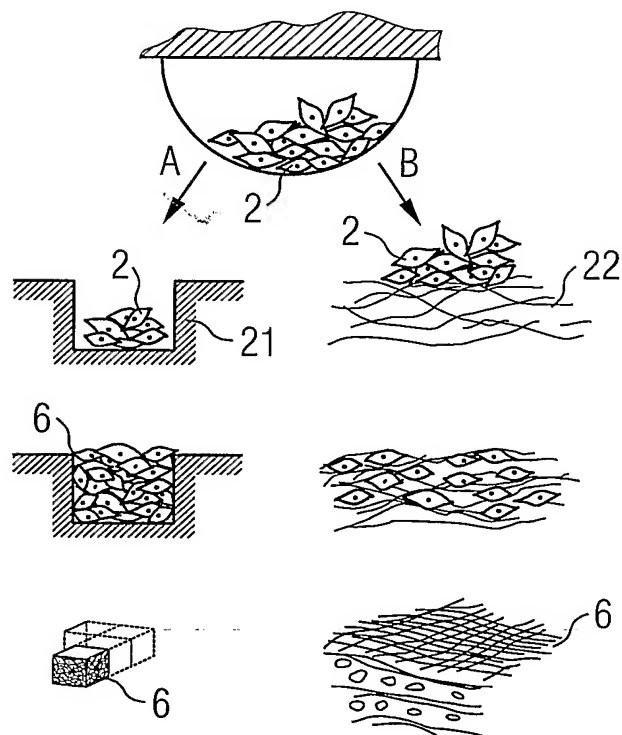
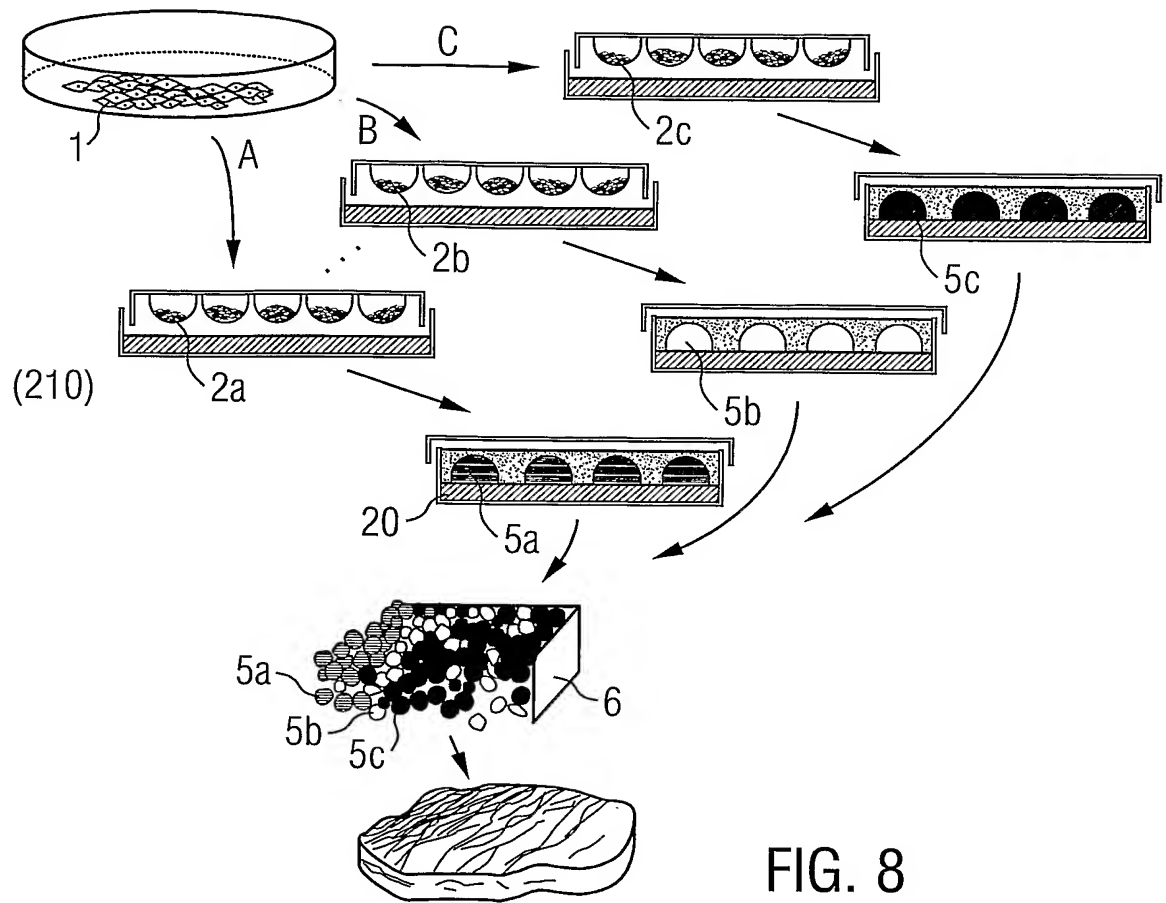


FIG. 7

4/5



5/5

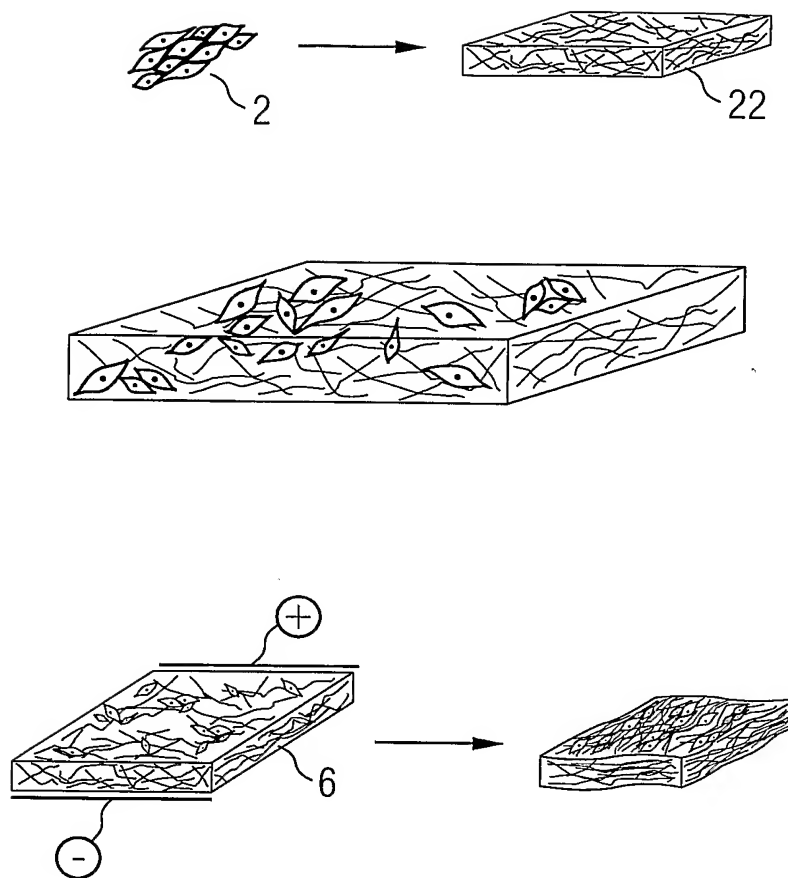


FIG. 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/002313

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/086107 A (DEVELOGEN AKTIENGESELLSCHAFT FUER ENTWICKLUNGSBIOLOGISCHE FORSCHUNG; I) 31 October 2002 (2002-10-31) page 8, lines 6-8; figure 2	1-27
X	RAMIYA VIJAYAKUMAR K ET AL: "Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells" NATURE MEDICINE, NATURE AMERICA, NEW YORK, US, vol. 6, no. 3, March 2000 (2000-03), pages 278-282, XP000864764 ISSN: 1078-8956 page 279, paragraphs 1,2; figure 3 ----- -/--	1-27

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 June 2005

Date of mailing of the international search report

27/06/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lanzrein, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2005/002313

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MITAKA TOSHIHIRO: "Reconstruction of hepatic organoid by hepatic stem cells." JOURNAL OF HEPATO-BILIARY-PANCREATIC SURGERY. 2002, vol. 9, no. 6, 2002, pages 697-703, XP002331148 ISSN: 0944-1166 figure 1	1,25
P,X	----- WO 2005/001072 A (FRAUNHOFER GESELLSCHAFT ZUR FOERDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E. V;) 6 January 2005 (2005-01-06) the whole document	1-27
P,X	----- WO 2005/001073 A (FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FOERDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V;) 6 January 2005 (2005-01-06) the whole document	1-27
P,X	----- KRUSE, C. ET AL: "Pluripotency of adult stem cells derived from human and rat pancreas" APPLIED PHYSICS A: MATERIALS SCIENCE & PROCESSING , A79(7), 1617-1624 CODEN: APAMFC; ISSN: 0947-8396, 2004, XP002331149 figure 2 -----	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/002313

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02086107	A	31-10-2002	DE 10290025 T0	09-10-2003
			WO 02086107 A2	31-10-2002
			EP 1379626 A2	14-01-2004
			JP 2004527249 T	09-09-2004
			US 2005054102 A1	10-03-2005
WO 2005001072	A	06-01-2005	DE 10362002 A1	03-02-2005
			WO 2005001072 A1	06-01-2005
			WO 2005001073 A1	06-01-2005
			US 2005014254 A1	20-01-2005
WO 2005001073	A	06-01-2005	DE 10362002 A1	03-02-2005
			WO 2005001072 A1	06-01-2005
			WO 2005001073 A1	06-01-2005
			US 2005014254 A1	20-01-2005

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N5/06

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 02/086107 A (DEVELOGEN AKTIENGESSELLSCHAFT FUER ENTWICKLUNGSBIOLOGISCHE FORSCHUNG; I) 31. Oktober 2002 (2002-10-31) Seite 8, Zeilen 6-8; Abbildung 2 -----	1-27
X	RAMIYA VIJAYAKUMAR K ET AL: "Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells" NATURE MEDICINE, NATURE AMERICA, NEW YORK, US, Bd. 6, Nr. 3, März 2000 (2000-03), Seiten 278-282, XP000864764 ISSN: 1078-8956 Seite 279, Absätze 1,2; Abbildung 3 ----- -/--	1-27



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. Juni 2005

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

27/06/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Lanzrein, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	MITAKA TOSHIHIRO: "Reconstruction of hepatic organoid by hepatic stem cells." JOURNAL OF HEPATO-BILIARY-PANCREATIC SURGERY. 2002, Bd. 9, Nr. 6, 2002, Seiten 697-703, XP002331148 ISSN: 0944-1166 Abbildung 1	1,25
P,X	----- WO 2005/001072 A (FRAUNHOFER GESELLSCHAFT ZUR FOERDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E. V;) 6. Januar 2005 (2005-01-06) das ganze Dokument	1-27
P,X	----- WO 2005/001073 A (FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FOERDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V;) 6. Januar 2005 (2005-01-06) das ganze Dokument	1-27
P,X	----- KRUSE, C. ET AL: "Pluripotency of adult stem cells derived from human and rat pancreas" APPLIED PHYSICS A: MATERIALS SCIENCE & PROCESSING , A79(7), 1617-1624 CODEN: APAMFC; ISSN: 0947-8396, 2004, XP002331149 Abbildung 2	1-27

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/002313

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 02086107 A	31-10-2002	DE 10290025 T0	09-10-2003
		WO 02086107 A2	31-10-2002
		EP 1379626 A2	14-01-2004
		JP 2004527249 T	09-09-2004
		US 2005054102 A1	10-03-2005
WO 2005001072 A	06-01-2005	DE 10362002 A1	03-02-2005
		WO 2005001072 A1	06-01-2005
		WO 2005001073 A1	06-01-2005
		US 2005014254 A1	20-01-2005
WO 2005001073 A	06-01-2005	DE 10362002 A1	03-02-2005
		WO 2005001072 A1	06-01-2005
		WO 2005001073 A1	06-01-2005
		US 2005014254 A1	20-01-2005